

Epigenetski mehanizmi u razvoju sisavaca

Dudaš, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:034551>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EPIGENETSKI MEHANIZMI U RAZVOJU SISAVACA

**EPIGENETIC MECHANISMS IN MAMMALIAN
DEVELOPMENT**

SEMINARSKI RAD

Ana Dudaš

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentorica: doc. dr. sc. Romana Gračan

Zagreb, 2019.

Sadržaj

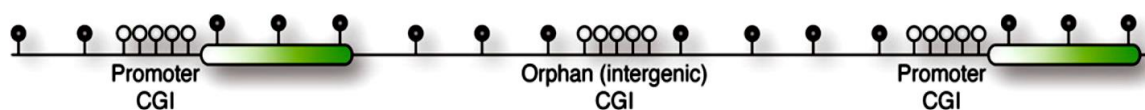
1. UVOD	1
<i>1.1. Epigenetske modifikacije genoma</i>	1
<i>1.2. Epigenetska dinamičnost u razvoju sisavaca</i>	2
2. MEHANIZMI METILACIJE I DEMETILACIJE DNA	3
2.1. Uloga metilacije DNA u transkripcijskoj kontroli	3
2.1.1. Metilacija promotora	3
2.1.2. Metilacija pojačivačkih sljedova u DNA	4
2.1.3. Metilacija utisnutih gena	5
2.2. Metilacijska mašinerija	6
2.2.1. Održavanje metilacijskih oznaka	6
2.2.2. De novo metilacija	6
2.3. Demetilacija DNA	7
2.3.1. Pasivni mehanizam	7
2.3.2. Aktivni mehanizam	9
3. EPIGENETSKO REPROGRAMIRANJE U PREDIMPLANTACIJSKOM	
EMBRIJU	11
3.1. <i>Aktivna demetilacija očinskog i pasivna demetilacija majčinskog genoma</i>	11
3.2. <i>Razlikovanje roditeljskih genoma</i>	14
3.3. <i>Očuvanje metilacijskih oznaka utisnutih gena</i>	15
4. ZAKLJUČAK	17
5. LITERATURA	18
6. SAŽETAK	23
7. SUMMARY	24

1. UVOD

1.1. Epigenetske modifikacije genoma

Epigenetika je skup mehanizama pomoću kojih se stanicama može promijeniti fenotip bez utjecaja na genotip. Mehanizmi pomoću kojih se kromatin može mijenjati tijekom epigenetskih modifikacija jesu metilacija DNA, modifikacija histona, remodeliranje nukleosoma te reorganizacija kromatina na višoj razini. Epigenetski profili pojedinih stanica mogu se mijenjati tijekom njihove diferencijacije, no izrazito je bitno da su ove promjene nasljedne, to jest da se prilikom mitoze prenose sa stanice majke na stanice kćeri pomoću različitih enzima koji održavaju epigenetski status pojedinih stanica. Jedan od najvažnijih i najbolje opisanih epigenetskih mehanizama jest metilacija dušične baze citozin na petoj poziciji koja se odvija pomoću enzima DNA-metiltransferaza. Točna uloga metilacije DNA ovisi o organizmu u kojem se ona događa te je tako kod sisavaca ona ključna za pravilan razvoj embrija te održavanje homeostaze u odraslim jedinkama. U genomima sisavaca uglavnom su metilirani citozini koji se nalaze u takozvanim CpG regijama, u kojima nakon svake dušične baze citozin slijedi dušična baza gvanin, a genomske regije koje sadrže velik broj ponavljanja CpG sekvenci, dužine 500-2000 parova baza, nazivaju se CpG otočići. Oni su u genomima sisavaca uglavnom hipometilirani te se mogu naći u promotorima nekih gena ili u međugenskim regijama (slika 1; Deaton i Bird, 2011).

Global bimodal CpG and 5mC distribution



Slika 1. Prikaz distribucije i metilacijskih oznaka CpG regija i CpG otočića (CGI) u genomu. Metilirane CpG regije prikazane su crnim kuglicama, dok su nemetilirane CpG regije prikazane bijelim kuglicama. Preuzeto iz Messerschmidt i sur. (2014).

1.2. Epigenetska dinamičnost u razvoju sisavaca

Od oplodnje do završetka implantacije, razvitak embrija može se podijeliti u nekoliko vrlo dobro organiziranih i reguliranih stadija – oplodnja, brazdanje, nastanak morule te formiranje blastociste. Tijekom ovog razvojnog perioda sve stanice imaju jednak razvojni potencijal, to jest mogu se diferencirati u bilo koji tip stanica. Prilikom diferencije se u genomima takvih pluripotentnih stanica pomoću raznih epigenetskih mehanizama uspostavlja ekspresijski obrazac karakterističan za pojedini tip stanica te se time stanice usmjeravaju u samo jedan razvojni obrazac i onemogućava se njihov povratak u pluripotentno stanje. Zahvaljujući, dakle, upravo raznolikim ekspresijskim obrascima uspostavljenim tijekom uvođenja epigenetskih modifikacija u genome pluripotentnih stanica, one nakon diferencijacije, iako imaju isti nasljedni materijal, mogu obavljati različite funkcije. Veliki val globalnog epigenetskog reprogramiranja genoma u razvoju sisavaca događa se tako u predimplantacijskom embriju čime se omogućuje brisanje roditeljskih oznaka iz genoma zigote te nastanak pluripotentnih stanica iz kojih kasnije tijekom razvoja nastaju svi tipovi stanica u organizmu.

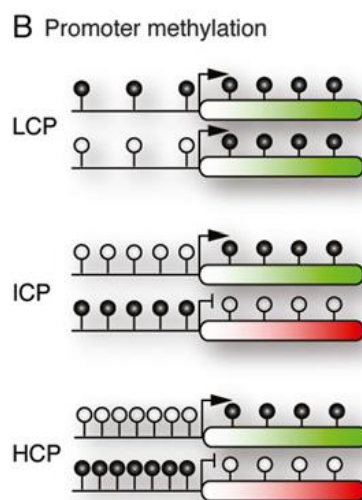
Razumijevanje epigenetskih procesa tijekom embrionalnog razvoja dodatno je omogućeno razvitkom tehnika sekvenciranja nove generacije koje otkrivaju epigenetske modifikacije u genomu čime je omogućena epigenetska analiza embrija u različitim stadijima razvitka (Borgel i sur., 2010; Smith i sur., 2012). Razjašnjavanju ove problematike također su uvelike pridonijela i otkrića enzima koji sudjeluju u metilaciji, ali i u procesima aktivnog uklanjanja metilacijskih oznaka iz molekule DNA, no potpuno razumijevanje dinamike ovih procesa do danas ipak ostaje nerazjašnjeno. U ovom ću radu pružiti pregled mehanizama pomoću kojih dolazi do uspostavljanja epigenetskih oznaka u genomu tijekom embrionalnog razvoja s naglaskom na metilaciju te objediniti dosadašnja saznanja o mehanizmima epigenetskog reprogramiranja koji se odvijaju u embriju sisavaca prije same implantacije.

2. MEHANIZMI METILACIJE I DEMETILACIJE DNA

2.1. Uloga metilacije DNA u transkripcijskoj kontroli

2.1.1. Metilacija promotora

U prošlosti se smatralo kako je metilacija promotora nedvojbeno uključena u utišavanje gena, no kasnije je primijećeno kako se u promotorima esencijalnih gena ili gena bitnih za razvoj mogu pronaći CpG otočići u kojima citozin ostaje hipometiliran iako je gen transkripcijski neaktivan. Iako je to bilo suprotno dotadašnjem shvaćanju, daljnja istraživanja pokazala su kako bi to ipak moglo omogućiti vezanje transkripcijskih faktora za promotor koji sprječavaju pristup enzimima uključenim u metilaciju, a time i samu metilaciju promotora (Brandeis i sur., 1994). Promotori koji sadrže CpG otočiće mogu se tako na temelju različitog sadržaja C:G parova baza i dužine sekvence CpG regija podijeliti u tri kategorije: promotori velike, srednje i male gustoće CpG-a (slika 2; Weber i sur., 2007). Upravo je svrstavanjem promotora u ove kategorije moguće objasniti regulaciju njihove aktivnosti metilacijom.



Slika 2. Prikaz tri kategorije promotora koji sadrže CpG otočiće te njihov odgovor na metilaciju. Mogu se vidjeti promotori velike gustoće (HCP), srednje gustoće (ICP) i male gustoće CpG-a (LCP). Metilirani CpG prikazani su crnim kuglicama, a nemetilirani bijelim. Preuzeto iz Messerschmidt i sur. (2014).

Promotori velike gustoće CpG-a (HCP, *High CpG Promoters*) rijetko su metilirani te njihovom metilacijom dolazi do učinkovitog utišavanja gena (slika 2). Promotori srednje gustoće CpG-a (ICP, *Intermediate CpG Promoters*) također su inaktivni ukoliko je došlo do njihove metilacije (slika 2; Borgel i sur., 2010). Neki od promotora ove vrste su promotori gena za pluripotentnost, kao što su *Oct4* i *Nanog*, pa tako njihovom metilacijom i utišavanjem ekspresije gena koji su pod njihovom kontrolom započinje diferencijacija stanica (Weber i sur., 2007; Borgel i sur., 2010). Za razliku od prethodno navedenih promotora s velikom i srednjom gustoćom CpG-a, promotori s malom gustoćom CpG-a (LCP, *Low CpG Promoters*) uglavnom su hipermetilirani te ostaju aktivni bez obzira na njihov metilacijski status (slika 2; Weber i sur., 2007).

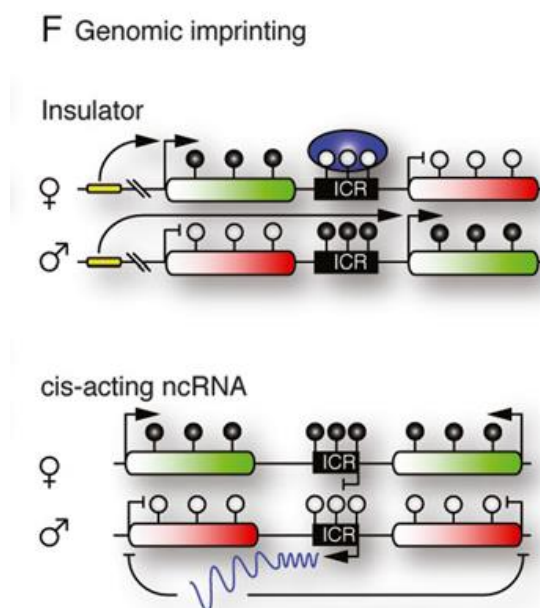
Osim metilacije CpG otočića, epigenetski mehanizam koji također ima značajnu ulogu u utišavanju promotora te sprječavanju ekspresije pojedinih gena je dimetilacija histona H3 na četvrtom lizinu (H3K9me2). Time nastaje transkripcijski neaktivan heterokromatin pa ne može doći do ekspresije gena pod kontrolom promotora s ovakvom epigenetskom modifikacijom kromatina (Epsztejn-Litman i sur., 2008). Stabilno utišavanje promotora se, dakle, postiže kombinacijom metilacije histona H3K9, koja dovodi do formiranja heterokromatina, te metilacije DNA koja osigurava dugotrajno utišavanje.

2.1.2. Metilacija pojačivačkih sljedova u DNA

Pojačivački sljedovi u molekuli DNA specifična su mjesta u genomu za koja se vežu transkripcijski aktivatori te oni potom, u kontaktu s transkripcijskim faktorima, uvelike pojačavaju ekspresiju pojedinih gena. Ti su sljedovi također vrlo bitni u procesu diferencijacije stanica budući da pomažu u uspostavljanju ekspresije točno određenih gena. Pojačivački sljedovi, baš kao i promotori, imaju specifičan metilacijski obrazac, a njihova je hipometilacija, baš kao i kod HCP-a i ICP-a, povezana s aktivnom ekspresijom gena (Carone i sur., 2010). Zanimljivo je kako je u istraživanju Arana i sur. (2013) pokazano kako metilacija pojačivača u tumorskim stanicama ima veći utjecaj na promjenu ekspresije gena nego što to ima metilacija promotora što bi također bilo korisno ispitati tijekom embrionalnog razvoja kako bi se proširilo razumijevanje epigenetskih procesa i njihovog utjecaja na razvoj sisavaca.

2.1.3. Metilacija utisnutih gena

Metilacija DNA, između ostalog, vrlo je bitna za regulaciju ekspresije utisnutih gena (Ferguson-Smith, 2011). Karakteristika ovih gena je njihova specifična ekspresija samo s jednog roditeljskog alela što se postiže različitom metilacijom kontrolnih regija navedenih gena na majčinskom, odnosno očinskom alelu. Metilacija kontrolnih regija potom pokreće i kontrolira niz mehanizama, poput vezanja proteina izolatora ili ekspresije nekodirajućih *antisense* RNA molekula (slika 3), što rezultira ekspresijom utisnutih gena s točno određenog roditeljskog alela.



Slika 3. Prikaz održavanja ekspresije alelno-specifičnih utisnutih gena. Metilacija DNA na kontrolnim regijama (ICR) regulira vezanje proteina izolatora ili ekspresiju nekodirajućih antisense RNA molekula (ncRNA). Preuzeto iz Messerschmidt i sur. (2014).

Ovaj tip diferencijalne metilacije odvija se tijekom diferencijacije gameta, a ekspresija gena s određenog roditeljskog alela očuvana je tijekom cijelog života. Utisnuti geni predstavljaju velik izazov u spolnom razmnožavanju budući da se njihove metilacijske oznake trebaju ukloniti u primordijalnim spolnim stanicama, ponovno se uspostaviti u gametama te očuvati tijekom reprogramiranja genoma u embriju. Oni imaju vrlo bitnu ulogu u razvoju i

rastu potomaka, a poremećaji u regulaciji njihove ekspresije rezultiraju velikim fenotipskim promjenama tijekom embrionalnog razvoja.

2.2. Metilacijska mašinerija

Enzimi DNA-metiltransferaze kataliziraju prijenos metilne skupine sa S-adenozil-metionina na peto mjesto u dušičnoj bazi citozin. Ti enzimi tako mogu održavati metilacijski obrazac stanica nakon semikonzervativne replikacije molekule DNA, kojom nastaju hemimetilirane molekule DNA, čime se osigurava sposobnost nasljeđivanja epigenetskih oznaka ili pak mogu sudjelovati u stvaranju novih metilacijskih oznaka (Holliday i Pugh, 1975).

2.2.1. Održavanje metilacijskih oznaka

Za održavanje metilacijskih oznaka u novonastalim molekulama DNA nakon semikonzervativne replikacije potrebne su DNA-metiltransferaze velikog afiniteta za hemimetilirane CpG regije. Takvo obilježje pokazuje enzim DNMT1 koji je prva otkrivena DNA-metiltransferaza kod eukariota (Yoder i sur., 1997). Njegova je ekspresija regulirana transkripcijskim faktorima ovisnima o staničnom ciklusu koji se pojavljuju u S fazi pa je stoga uvelike eksprimiran u većini mitotskih stanica (Kishikawa i sur., 2003). Enzim DNMT1 nalazi se na replikacijskim rašljama gdje se smješta zahvaljujući nekovalentnim interakcijama koje ostvaruje s proteinom NP95 (Leonhardt i sur., 1992). Naime, NP95 veže se za proteinski kompleks PCNA koji obuhvaća molekulu DNA prilikom replikacije te se nalazi u kontaktu s DNA polimerazom. NP95 veže DNMT1 za lanac kalup koji je metiliran kako bi se enzim orijentirao prema novonastalom lancu koji tek treba metilirati (Sharif i sur., 2007). Kod miševa su pronađene dvije izoforme proteina kodirane lokusom *Dnmt1*: somatska (*Dnmt1s*) i specifična za oocitu (*Dnmt1o*) (Gaudet i sur., 1998; Mertineit i sur., 1998). Pokusi na miševima pokazali su kako su delecije lokusa *Dnmt1* ili *Np95* tijekom ili nakon gastrulacije letalni (Sharif i sur., 2007) što ukazuje na važnost održavanja metilacijskih oznaka u genomu prilikom embrionalnog razvitka.

2.2.2. De novo metilacija

DNA-metiltransferaze koje mogu uvoditi nove metilacijske oznake u genomu su DNMT3A i DNMT3B (Okano i sur., 1999) koji u kromatinu prepoznaju nemodificirane

histone H3 čime se dovode do regija koje trebaju metilirati, a alosterički su inhibirani metilacijom histona H3 na četvrtom lizinu (H3K4) (Otani i sur., 2009). Gen *Dnmt3a* nasljeđuje se od majke te se eksprimira u oocitama i predimplantacijskom embriju, dok enzim DNMT3A uspostavlja različite metilacijske obrasce u kontrolnim regijama utisnutih gena u muškim i ženskim gametama (Kaneda i sur., 2004; Kato i sur., 2007). Transkripcija gena *Dnmt3b* započinje pak uslijed aktivacije zigotnog genoma te je on snažno ekspimiran do stadija blastociste nakon kojeg je ekspresija ovog gena ograničena uglavnom na epiblast (Watanabe i sur., 2002). Treća *de novo* DNA-metiltransferaza je DNMT3L. Ona nema katalitičku domenu na N-kraju, ali je potrebna za uspostavljanje metilacijskih oznaka u kontrolnim regijama utisnutih gena u gametama (Bourc'his i sur., 2001; Bourc'his i Bestor, 2004) te kao važan aktivacijski kofaktor za enzime DNMT3A/B (Gowher i sur., 2005). Delecija gena *Dnmt3b* u embrijima letalna je, dok su embriji s delecijom *Dnmt3a* djelomično vijabilni (Okano i sur., 1999). Delecijom gena *Dnmt3l* kod miševa pak ne dolazi do letalnih učinaka, ali nedostatak *de novo* metilacije u spolnim stanicama uzrokuje sterilnost kod mužjaka te letalnost embrija koji su potomci ženki s ovom delecijom (Bourc'his i sur., 2001; Bourc'his i Bestor, 2004). Iz provedenih pokusa u kojima su se deletirali razni geni uključeni u *de novo* metilaciju DNA može se zaključiti kako je uspostavljanje novih metilacijskih obrazaca u genomu embrija bitno ne samo za razvoj i preživljavanje embrija, već i za rađanje plodnog potomstva.

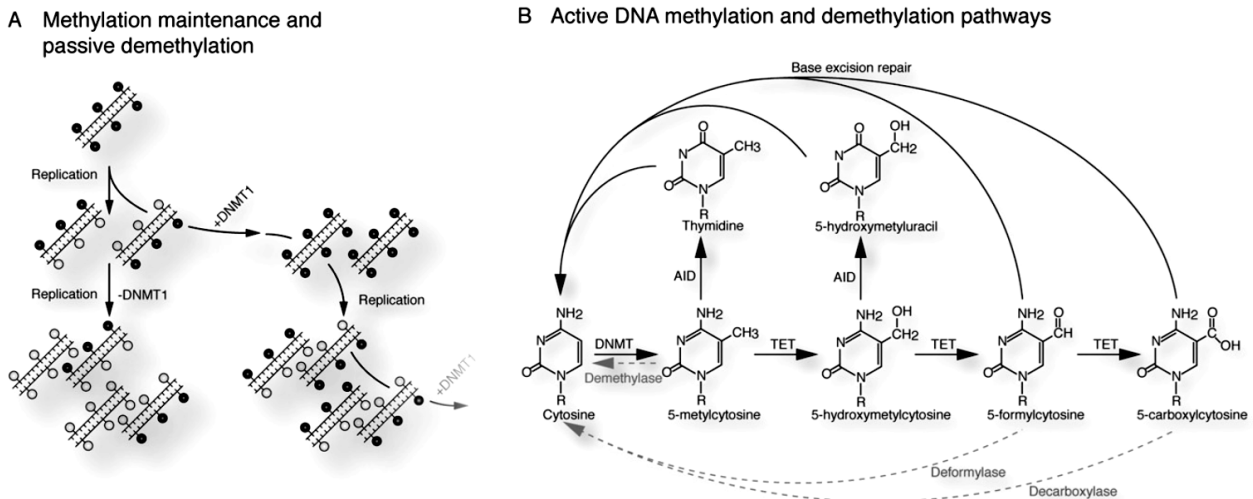
2.3. Demetilacija DNA

Demetilacija je također vrlo bitan proces u razvoju sisavaca, a njena je funkcija uklanjanje metilacijskih oznaka iz roditeljskih genoma kako bi se uspostavilo pluripotentno stanje stanica. Usprkos vrlo uređenom mehanizmu metilacije posredovanom enzimima, enzimi koji bi uklanjali metilne skupine s modificiranih baza u molekuli DNA do danas nisu opisani. Umjesto toga opisana su dva mehanizma koja objašnjavaju proces demetilacije DNA u stanici – aktivni i pasivni (Wu i Zhang, 2014).

2.3.1. Pasivni mehanizam

Pasivni mehanizam demetilacije DNA u stanici podrazumijeva smanjenu ekspresiju ili uklanjanje iz jezgre proteina koji su ključne komponente u procesu metilacije DNA, kao što su to protein DNMT1 ili njegov regrutirajući faktor NP95. U ovom mehanizmu gubitak

metilacijskih oznaka u molekuli DNA događa se uslijed većeg broja dioba stanica. Naime, metilacijske se oznake u ovom slučaju ne mogu prenositi na stanice kćeri budući da se prilikom svake replikacije DNA metilacijske oznake ne prenose na novonastale lance DNA te njihove CpG regije ostaju nemetilirane (slika 4A).



Slika 4. Prikaz aktivnog i pasivnog mehanizma demetilacije DNA. (A) Pasivni mehanizam demetilacije DNA u kojem nakon uklanjanja proteina DNMT1 iz jezgre nakon niza dioba dolazi do gubitka metilacijskih oznaka u DNA. Ukoliko je DNMT1 prisutan, metilacijske oznake DNA se nakon svake replikacije obnavljaju. Metilirani CpG prikazani su crnim kuglicama, a nemetilirani bijelim. (B) Mogući aktivni mehanizam demetilacije DNA: mogućnost postojanja dekarboksilaze koja 5caC pretvara direktno u citozin. TET enzimi kataliziraju oksidaciju 5mC u 5hmC, 5fC i 5caC. Deaminacijom 5mC i 5hmC pomoću enzima AID nastaju timin, odnosno 5-hidroksimetiluracil te se pokreće popravak DNA izrezivanjem baza što rezultira ugradnjom nemodificiranog citozina u DNA. Popravkom DNA izrezivanjem baza mogu se ukloniti 5fC i 5caC bez prethodnog koraka deaminacije. Preuzeto iz Messerschmidt i sur. (2014).

Ipak, ovim se mehanizmom ne može objasniti pojava gubitka metilacijskih oznaka u stanicama koje se dijele sporo ili se uopće ne dijele. Također, demetilacija postignuta na pasivan način generalna je te njome nije moguće postići demetilaciju određenih regija u genomu.

2.3.2. Aktivni mehanizam

Drugi mehanizam kojim se objašnjava kako dolazi do demetilacije molekule DNA je mehanizam takozvane aktivne demetilacije. Metilne se skupine uklanjaju tako da se potiče deaminacija metiliranog citozina pomoću deaminaze inducirane aktivacijom (AID) (slika 4B). Deaminacijom metilirani citozin postaje timin te u DNA nastaje krivo spareni par baza G:T. Timin u takvom paru potom prepoznaje timin-DNA glikozilaza (TDG) ili protein 4 s metil-CpG-vezujućom domenom (MBD4) koji cijepaju N-glikozidnu vezu između timina i deoksiriboze, stvaraju abazično mjesto u molekuli DNA te pokreću mehanizam popravka DNA izrezivanjem baza nakon čega se u DNA ugrađuje nemetilirani citozin te tako dolazi do uklanjanja početne metilacijske oznake (slika 4B; Morgan i sur., 2004). Novo moguće objašnjenje aktivnog puta demetilacije DNA nametnulo se otkrićem enzima iz TET obitelji dioksidogenaza (Tahiliani i sur., 2009). TET enzimi kataliziraju oksidaciju 5-metilcitozina (5mC) u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), 5-formilcitozin (5fC) te konačno u 5-karboksicitozin (5caC) (slika 4B; Ito i sur., 2011), no uloga ovih derivata citozina do danas ostaje nerazjašnjena. Promatrajući enzime u reakcijama iz metaboličkog otpada kojima se recikliraju pirimidinske dušične baze može se uočiti dekarboksilaza što upućuje na to kako bi sličan enzim mogao oksidirani derivat citozina, 5caC, prevoditi u nemodificirani citozin (slika 4B; Ito i sur., 2010). Također je otkriveno kako deaminacijski enzimi TDG, MBD4 i slični mogu ukloniti oksidirane derivate 5mC te tako stvoriti abazična mjesta u DNA i pokrenuti popravak DNA izrezivanjem baza (slika 4B). TDG može također ukloniti 5fC i 5caC bez prethodnog koraka deaminacije metiliranog citozina kao što je potrebno kod prethodno razjašnjenog puta aktivne deaminacije (slika 4B; He i sur., 2011). Oksidirani derivat 5hmC također potpomaže u pasivnom mehanizmu demetilacije, budući da enzim DNMT1 pokazuje znatno manji afinitet vezanja za hemimetiliranu DNA koja sadrži 5hmC, što onemogućava prijenos metilacijskih oznaka na novosintetizirani lanac DNA prilikom njene replikacije (Valinluck i Sowers, 2007). Kod miševa su poznata tri gena za enzime iz porodice TET, *Tet1-3*, koji su različito eksprimirani tijekom razvoja i u diferenciranim tkivima (Tahiliani i sur., 2009). Ekspresija gena *Tet1* i *Tet2* lokalizirana je tijekom razvoja u embrionalnim matičnim stanicama i primordijalnim spolnim stanicama, dok je ekspresija *Tet2* izrazito bitna u hematopoetskim stanicama (Li i sur., 2011). Embriji miševa s deletiranim genom *Tet1* preživljavaju, ali su manje veličine u odnosu na miševe bez ove mutacije te su ženke i mužjaci s ovom mutacijom smanjeno plodni (Dawlaty i sur., 2011). Dvostruka delecija gena *Tet1* i *Tet2* uzrokuje ozbiljnije probleme u razvoju, no može i dalje može doći do djelomično normalnog razvoja

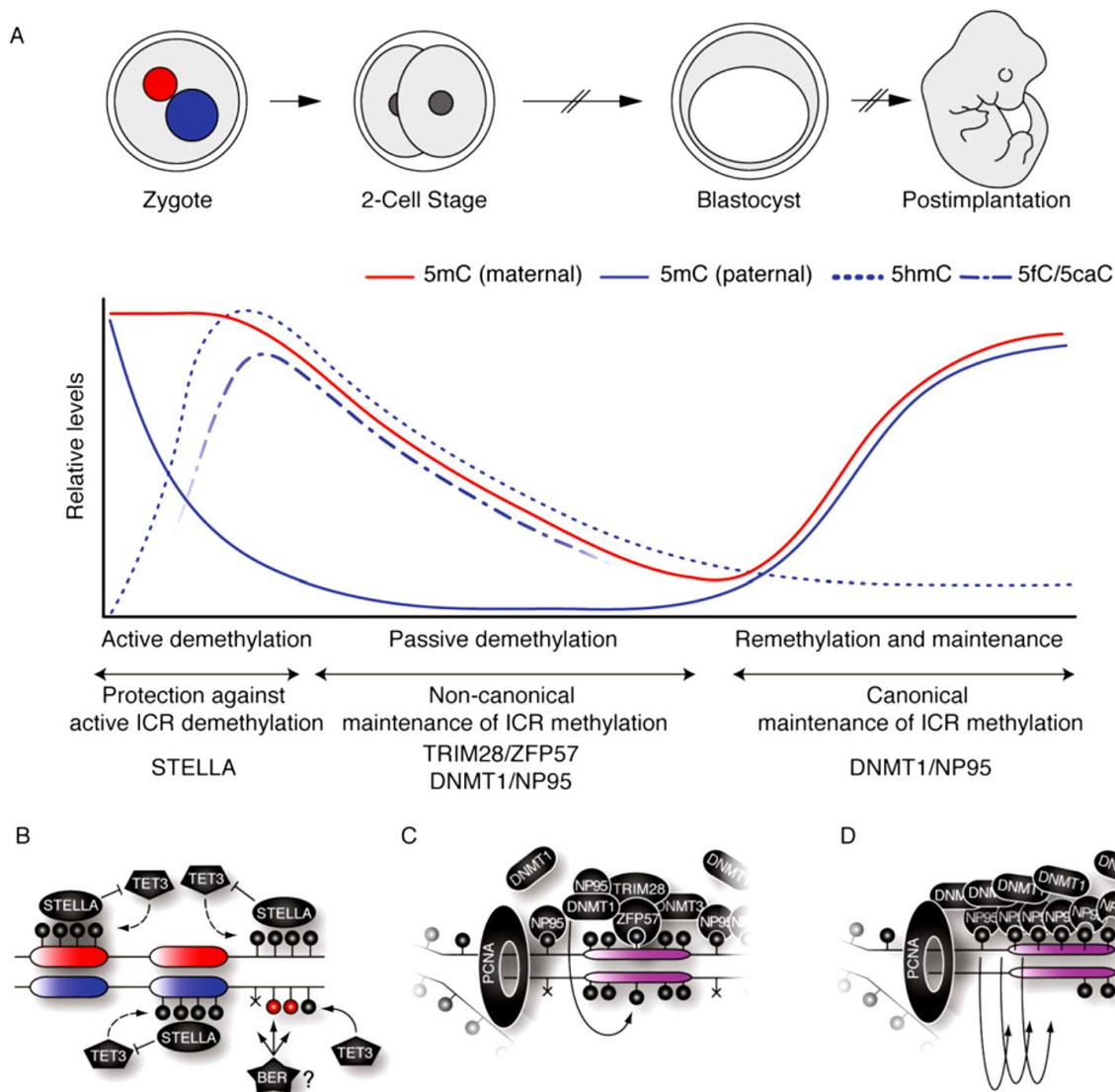
što je potaknulo mišljenje kako je uloga ovih gena djelomično suvišna te ukazalo na potrebu za daljnjim istraživanjima (Dawlaty i sur., 2013). Ekspresija gena *Tet3* djelomično se preklapa s onom gena *Tet1/2*, no najviša razina ekspresije postiže se u oocitama, spermijima te u ranom predimplantacijskom embriju. Delecija ovog gena, naslijeđenog od majke, može uzrokovati znatne poteškoće pa čak i zastoj u razvoju embrija (Gu i sur., 2011).

3. EPIGENETSKO REPROGRAMIRANJE U PREDIMPLANTACIJSKOM EMBRIJU

Jedan od valova globalnog epigenetskog reprogramiranja u ranoj embriogenezi odvija se u predimplantacijskom embriju. Novoformirani embrij prolazi kroz val demetilacije kojim se postiže uspostavljanje pluripotentnosti u stanicama, a razine metilacije u genomu dosežu najniže vrijednosti već u stadiju rane blastociste s 32-64 stanica (slika 5). Utisnuti geni pak, čija ekspresija ovisi o tome jesu li naslijeđeni od majke ili oca, ostaju metilirani tijekom ovog vala demetilacije kako bi se specifičan obrazac ekspresije ovih gena zadržao kasnije u diferenciranim stanicama. Budući da genom zigote sadrži jedan kromosomski set porijeklom od majke, a jedan od oca, primijećeno je da brzina demetilacije svakog pojedinog kromosomskog seta slijedi znatno drugačiju kinetiku nakon oplodnje (slika 5; Mayer i sur., 2000; Santos i sur., 2002).

3.1. Aktivna i pasivna demetilacija roditeljskih genoma

Zreli spermiji pokazuju visoku razinu metilacije na što ukazuje činjenica da je 80-90% CpG-a u njihovom genomu metilirano (Popp i sur., 2010). Ipak, netom nakon oplodnje očinski se genom gotovo u potpunosti demetilira što upućuje na to da se metilacijske oznake u ovom slučaju uklanjaju aktivnim mehanizmom (Mayer i sur., 2000). Genomi jajnih stanica s druge strane pokazuju manju razinu metilacije od otprilike 40% te nakon oplodnje prolaze kroz mehanizam pasivne demetilacije, koji je znatno sporiji od onog aktivnog, što, budući da su roditeljski pronukleusi nakon oplodnje odvojeni otprilike 24 sata, dovodi do epigenetske asimetrije u ranom embriju (slika 5A; Mayer i sur., 2000; Santos i sur., 2002).



Slika 5. Prikaz dinamike demetilacije DNA te održavanje oznaka utisnutih gena u predimplantacijskom embriju. (A) Različita kinetika demetilacije majčinskog (crveni pronukleus, crvena linija) i očinskog (plavi pronukleus, plava linija) genoma koja dovodi do epigenetske asimetrije u zigoti. Majčinski genom prolazi kroz proces pasivne demetilacije DNA tijekom nekoliko ciklusa replikacije DNA. Očinski genom prolazi kroz proces aktivne demetilacije prije prve diobe zigote. Gubitak 5mC u očinskom genomu popraćen je s porastom količine njegovih oksidacijskih derivata 5hmC (plava istočkana linija) te 5fC i 5caC (plava isctana linija) čija se količina smanjuje tijekom niza replikacija DNA istovremeno s demetilacijom majčinskog genoma. (B) Protein STELLA štiti majčinski genom i regije utisnutih gena u očinskom genomu od oksidacije 5mC posredovane enzimom TET3 tako da se veže za kromatin s modifikacijom H3K9me2. Prikazana je i moguća uloga popravka DNA izrezivanjem baza (BER) u ugradnji nemedificiranih citozina u DNA. (C) Tijekom ranih dioba DNMT1 je uglavnom odsutan u jezgri te je usmjeren do kontrolnih regija utisnutih gena

pomoću kompleksa ZFP57/TRIM28 koji se veže za svoju metiliranu konsensus sekvencu. (D) U kasnijim stadijima embriogeneze i u odraslim tkivima velike razine DNMT1/NP95 održavaju metilacijske oznake u DNA vežući se za hemimetiliranu DNA. Preuzeto iz Messerschmidt i sur. (2014).

U demetilaciji očinskog genoma sudjeluje enzim TET3 koji se usmjerava na očinski pronukleus te katalizira oksidaciju 5mC u 5hmC što dovodi do aktivacije popravka DNA izrezivanjem baza i ugradnje nemodificiranog citozina u molekulu DNA kao što je prije opisano (slika 5A; Gu i sur., 2011). U odsustvu enzima TET3 nije primijećena pojava 5hmC u očinskom genomu što može uzrokovati zakašnjeslu aktivaciju gena naslijeđenih od oca bitnih za embrionalni razvitak i uspostavljanje pluripotentnog epiblasta, kao što su geni *Nanog* i *Oct4*, te dovesti do poremećaja u razvoju (Gu i sur., 2011). Iako je primijećena znatna razina 5hmC iz očinskog genoma u kasnoj zigoti, samo nekoliko regija pokazuju potpunu reverziju 5mC u nemodificirani citozin prije prve diobe. Gubitak metiliranog citozina može se objasniti pokretanjem mehanizma popravka DNA izrezivanjem baza (BER) što rezultira, između ostalog, hipometilacijom promotora već spomenutih gena bitnih u razvoju, *Nanog* i *Oct4*, te aktivacijom njihove ekspresije (Gu i sur., 2011). Spomenuti se derivat metiliranog citozina, 5hmC, ne izrezuje ovim putem, već se njegova količina smanjuje pasivnim putem uslijed niza replikacija DNA (slika 5A). Na važnost BER-a u demetilaciji očinskog genoma upućuju nekoliko proteina uključenih u ovaj mehanizam popravka DNA, kao što je XRCC1, koji se za očinski pronukleus vežu s velikim afinitetom dok se za majčinski pronukleus uopće ne vežu (Wossidlo i sur., 2010). Nadalje, u zigoti su primijećeni i ostali produkti nastali oksidacijom 5mC - 5fC i 5caC, koji su supstrati za TDG te uzrokuju pokretanje BER-a i demetilaciju DNA (He i sur., 2011). Ipak, budući da enzim TDG nije primijećen u zigoti, postoji mogućnost da 5fC i 5caC izrezuju neke druge DNA-glikozilaze (Hajkova, 2010). Važnost oksidiranih derivata 5mC-a, 5fC i 5caC, u demetilaciji DNA iz očinskog genoma očituje se također i u uklanjanju enzima DNMT1 iz jezgre predimplantacijskih embrija budući da navedeni enzim, kao što je spomenuto, ima vrlo mali afinitet za oksidirane derivate 5mC-a pa tijekom niza dioba bez njegove prisutnosti u jezgri dolazi do gubitka metilacijskih oznaka u DNA pasivnim mehanizmom (slika 5A; Hashimoto i sur., 2012).

Iako je aktivna demetilacija očinskog genoma vrlo korisna te osigurava učinkovito epigenetsko reprogramiranje genoma predimplantacijskog embrija, njen se veliki značaj u

razvitku embrija preispituje. Naime, gubitak enzima TET3 koji sudjeluje u mehanizmu aktivne demetilacije DNA rezultira normalnim razvojem embrija (Gu i sur., 2011) što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima kojima će se razjasniti dinamika i uloga pojedinih procesa u epigenetskom reprogramiranju tijekom embrionalnog razvoja.

3.2. Razlikovanje roditeljskih genoma

Razlikovanje očinskog od majčinskog genoma te prepoznavanje očinskog od strane enzima TET3 posredovano je djelovanjem proteina STELLA kojeg karakterizira vezanje za oba roditeljska genoma, ali afinitet vezanja za očinski znatno je manji nego za majčinski genom (slika 5B; Nakamura i sur., 2012). Zaštita majčinskog genoma od djelovanja enzima TET3 moguća je zbog specifične interakcije proteina STELLA s histonom H3 kojemu je lizin dimetiliran na devetom mjestu (H3K9me2). Ovako se obilježen histon H3 nalazi u velikim količinama u majčinskom genomu, dok se u očinskom genomu nalazi u malim količinama (Santos i sur., 2005). Interakcija između proteina STELLA i nukleosoma s H3K9me2 mijenja konformaciju majčinskog kromatina što sprječava vezanje enzima TET3, a time i oksidaciju 5mC (slika 5B; Nakamura i sur., 2012). Tako se omogućava postizanje različite dinamike demetilacije DNA dvaju roditeljskih genoma. Na značaj proteina STELLA u razlikovanju dva roditeljska genoma ukazali su pokusi u kojima su embriji s mutiranim genom za navedeni protein imali velike količine 5hmC u oba roditeljska genoma te su pokazivali vrlo teške fenotipe, a rijetko su preživljavali duže od četverostaničnog stadija (Wossidlo i sur. 2011). Osim zaštite majčinskog genoma, protein STELLA vrlo je bitan i u očuvanju metilacijskih oznaka utisnutih gena, kao što su *Rasgrfl* i *H19* koji se eksprimiraju s očevog alela, a u njegovoj odsutnosti demetilacija ovih gena je potpuna (Nakamura i sur., 2006). Naime, tijekom spermatogeneze kromatin na lokusima ovih gena sadrži modificirani histon H3K9me2 s kojim protein STELLA specifično interagira što nakon oplodnje štiti ove gene od demetilacije (Nakamura i sur., 2012).

3.3. Očuvanje metilacijskih oznaka utisnutih gena

Prilikom globalne demetilacije potrebno je očuvati metilacijske oznake utisnutih gena kao što je prije spomenuto. Istraživanja su pokazala kako delecija gena *Dnmt1* u zigoti uzrokuje gubitak metilacije DNA čak i u regijama s utisnutim genima što ima letalni učinak (Li i sur., 1993). To je otkriće dovelo u pitanje koja je uloga enzima DNMT1 u ranim predimplantacijskim embrijima budući da njegova prisutnost u jezgri zigote nije primijećena. Otkriveno je kako je poseban oblik navedene DNA-metiltransferaze specifičan za oocyte (DNMT1o) potreban za održavanje metilacijskih oznaka u regijama s utisnutim genima. Taj je enzim potreban samo tijekom jednog staničnog ciklusa u osmostaničnom stadiju embrija kada se nakratko premješta u jezgru (Ratnam i sur., 2002). Budući da se somatska izoforma enzima DNMT1 (DNMT1s) pojavljuje tek u stadiju blastociste, održavanje metilacijskih oznaka utisnutih gena tijekom ranijih dioba pripisano je nepoznatim DNA-metiltransferazama. Doduše, pokusi s embrijima u kojima su geni za majčinski (DNMT1o) i zigotni protein DNMT1 (DNMT1s) deletirani pokazali su kako dolazi do gubitka metilacijskih oznaka svih utisnutih gena što ukazuje na to kako oba oblika enzima DNMT1, DNMT1s i DNMT1o, sudjeluju u metilaciji utisnutih gena iako većina ovih proteina nije prisutna u jezgri (Branco i sur., 2008). Nadalje, postavlja se pitanje kako se enzim DNMT1 usmjerava prema lokusima utisnutih gena gdje održava njihove metilacijske oznake. Protein ZFP57 iz porodice KRAB također je povezan s očuvanjem metilacijskih oznaka utisnutih gena te njegova delecija u embrionalnim matičnim stanicama uzrokuje hipometilaciju majčinskih i očinskih kontrolnih regija utisnutih gena (Li i sur., 2008). Naime, proteini iz porodice KRAB djeluju kao epigenetski represori u interakciji s proteinom TRIM28. TRIM28 jedna je od komponenata multifunkcionalnog represora sačinjenog od kompleksa za remodeliranje nukleosoma i deacetilaciju histona, metiltransferaze SETDB1 koja katalizira modifikaciju histona H3 u H3K9me3, heterokromatinskog proteina 1 te, između ostalog, DNA-metiltransferaza DNMT1, DNMT3A i DNMT3B (Quenneville i sur., 2011). U embrijima i embrionalnim matičnim stanicama miša primijećeno je, naime, vezanje proteina ZFP57 i TRIM28 za lokuse utisnutih gena kao i prisutnost modificiranog histona H3K9me3 (Quenneville i sur., 2011; Messerschmidt i sur., 2012) što upućuje na sudjelovanje kompleksa ZFP57/TRIM28 u održavanju metilacijskih oznaka utisnutih gena (slika 5C). Budući da je protein ZFP57 transkripcijski faktor s DNA-vezujućom domenom, pretpostavljeno je kako postoji konsensus sekvenca koju ovaj protein prepoznaje i usmjerava cijeli navedeni proteinski kompleks do regija u DNA s utisnutim genima. Analizom sekvenci lokusa na koje se vežu proteini ZFP57 i

TRIM28 te koji su obogaćeni s histonom H3K9me3, otkrivena je heksanukleotidna konsensus sekvenca koju prepoznaje ZFP57 (5' TGCCGC 3') tek kada je ona metilirana i konzervirana je u 81 od 91 ispitivanih lokusa (Quenneville i sur., 2011). Interakcija proteina TRIM28 s kompleksom DNMT1/NP95 zaduženim za održavanje metilacijskih oznaka u DNA upućuje na usmjeravanje ovog kompleksa do kontrolnih regija utisnutih gena u predimplantacijskom embriju pomoću proteina ZFP57 (slika 5C). Ovakav način usmjeravanja objašnjava kako je moguće održavanje metilacijskih oznaka utisnutih gena usprkos tome što je enzim DNMT1 u jezgri tijekom ranih dioba prisutan u drastično malim količinama (Messerschmidt i sur., 2012). Tek u kasnijim fazama embrionalnog razvoja kada količine ovog enzima u jezgri porastu, nastupa klasičan način očuvanja metilacije DNA pomoću kompleksa DNMT1/NP95 (slika 5D). Moguća uloga *de novo* DNA-metiltransferaza DNMT3A i DNMT3B, koje su također prisutne u ZFP57/TRIM28 kompleksu, u održavanju metilacijskih oznaka u kontrolnim regijama utisnutih gena pretpostavljena je nakon otkrića da su čak i krajevi navedenih kontrolnih regija djelomično demetilirani (Tomizawa i sur., 2011). Naime, ovi bi enzimi mogli održavati metilacijske oznake na tim rubnim dijelovima kontrolnih regija u kasnijim stadijima razvoja. Ovaj gubitak metilacije, doduše, nema nikakvog utjecaja na sam razvoj sve dok regije u genomu koje prepoznaje protein ZFP57 ostaju metilirane.

4. ZAKLJUČAK

Epigenetski mehanizmi pokazali su se kao izrazito važni u razvoju sisavaca i diferencijaciji matičnih stanica, ali i u održavanju homeostaze kod odraslih jedinki. Razvitkom novih tehnologija u epigenetskim istraživanjima omogućen je uvid u epigenetske oznake cijelog genoma tijekom raznih stadija embrionalnog razvitka te je razumijevanje epigenetskog reprogramiranja u razvoju posve promijenjeno i nadopunjeno važnim saznanjima. Međutim, znanje o epigenetskim mehanizmima uključenim u razvoj sisavaca i dalje ostaje ograničeno. Otkrivene su razne DNA-metiltransferaze koje uvode nove metilacijske oznake u genom, kao što su DNMT3A i DNMT3B, ili održavaju takve oznake tijekom niza replikacija molekule DNA, kao što to radi enzim DNMT1, što osigurava nasljeđivanje epigenetskih modifikacija. Također su otkriveni i TET enzimi koji metilacijske oznake iz genoma uklanjaju na aktivan način čime je dodatno pojašnjena dinamika metilacije DNA te kako do nje dolazi, ali i kako se takve oznake mogu ukloniti iz genoma.

Ustanovljeno je također kako tijekom epigenetskog reprogramiranja u predimplantacijskom embriju dolazi do brze aktivne demetilacije očinskog te sporije pasivne demetilacije majčinskog genoma što dovodi do epigenetske asimetrije već u zigoti. Razlika u mehanizmu demetilacije kod roditeljskih genoma u zigoti posredovana je pak posebnim proteinom STELLA koji se preferencijalno veže na majčinski genom budući da on, za razliku od očinskog, ima kromatin s čestom modifikacijom H3K9me2 čime se štiti od pristupa enzima TET3, a time i aktivne demetilacije. Nadalje, postavljalo se pitanje kako se održavaju metilacijske oznake kontrolnih regija utisnutih gena tijekom epigenetskog reprogramiranja u embriju budući da bi gubitkom njihovih oznaka došlo do smrti ploda. Pokazano je kako poseban protein ZFP57 prepoznajući svoju konsensus sekvencu navodi DNA-metiltransferaze na te kontrolne regije te tako sprječava gubitak metilacije utisnutih gena i osigurava pravilan razvoj.

Glavno pitanje koje se danas postavlja je zašto uopće dolazi do takvog složenog epigenetskog reprogramiranja tijekom razvitka sisavaca. Iako je odgovor na to pitanje danas nemoguće dati, daljnjim istraživanjima te razvitkom novih tehnika koje bi mogle pomoći u točnijem detektiranju epigenetskih modifikacija i njihovom boljem razumijevanju, to bi se moglo dokučiti.

5. LITERATURA

- Aran D, Sabato S, Hellman A. 2013. DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol* 14: R21.
- Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schuebeler D, Sasaki H, Forne T, Weber M. 2010. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Publishing Group* 42: 1093–1100.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294: 2536–2539.
- Bourc'his D, Bestor TH. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431: 96–99.
- Branco MR, Oda M, Reik W. 2008. Safeguarding parental identity: Dnmt1 maintains imprints during epigenetic reprogramming in early embryogenesis. *Genes Dev* 22: 1567–1571.
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H. 1994. Sp1 elements protect a CpG island from *de novo* methylation. *Nature* 371: 435–438.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, *et al.* 2010. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143: 1084–1096.
- Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu YC, Markoulaki S, Cheng AW, Gao Q, Kim J, Choi SW, Page DC, *et al.* 2011. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell* 9: 166–175.
- Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, Gao Q, Powell BE, Li Z, Xu M, *et al.* 2013. Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell* 24: 310–323.
- Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25: 1010–1022.
- Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, Shufaro Y, Gerson A, Ueda J, Bergman Y, *et al.* 2008. De novo DNA methylation promoted by G9A prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15: 1176–1183.
- Ferguson-Smith AC. 2011. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm.

- Nat Rev Genet* 12: 565–575.
- Gaudet F, Talbot D, Leonhardt H, Jaenisch R. 1998. A short DNA methyltransferase isoform restores methylation in vivo. *J Biol Chem* 273: 32725–32729.
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. 2005. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 280: 13341–13348.
- Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, *et al.* 2011. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477: 606–610.
- Hajkova P. 2010. Epigenetic reprogramming—taking a lesson from the embryo. *Curr Opin Cell Biol* 22: 342–350.
- Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, Zhang X, Cheng X. 2012. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* 40: 4841–4849.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, *et al.* 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333: 1303–1307.
- Holliday R, Pugh JE. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226–232.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466: 1129–1133.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333: 1300–1303.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429: 900–903.
- Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H. 2007. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 16: 2272–2280.
- Kishikawa S, Murata T, Ugai H, Yamazaki T, Yokoyama KK. 2003. Control elements of

- Dnmt1 gene are regulated in cellcycle dependent manner. *Nucleic Acids Res* 3: 307–308.
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71: 865–873.
- Li E, Beard C, Jaenisch R. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366: 362–365.
- Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith AC. 2008. A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell* 15: 547–557.
- Li Z, Cai X, Cai CL, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang FC, Xu M. 2011. Deletion of *Tet2* in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* 118: 4509–4518.
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501–502.
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH. 1998. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125: 889–897.
- Messerschmidt DM, de Vries W, Ito M, Solter D, Ferguson-Smith A, Knowles BB. 2012. *Trim28* is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. *Science* 335: 1499–1502.
- Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter, D. 2014. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*, 28(8): 812-828.
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279: 52353–52360.
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, *et al.* 2006. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 9: 64–71.
- Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. 2012. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486: 415–419.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247–257.

- Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M. 2009. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX–DNMT3–DNMT3L domain. *EMBO Rep.* 10: 1235–1241 (2009).
- Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W. 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463: 1101–1105.
- Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S, Baglivo I, Pedone PV, Grimaldi G, Riccio A, *et al.* 2011. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell* 44: 361–372.
- Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM. 2002. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245: 304–314.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241: 172–182.
- Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean W. 2005. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* 280: 225–236.
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S-I, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, *et al.* 2007. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450: 908–912.
- Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A, Meissner A. 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484: 339–344.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, *et al.* 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930–935.
- Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. 2011. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development* 138: 811–820.
- Valinluck V, Sowers LC. 2007. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 67: 946–950.

- Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. 1997. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 270: 385–395.
- Watanabe D, Suetake I, Tada T, Tajima S. 2002. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev* 118: 187–190.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paeaebo S, Rebhan M, Schuebeler D. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457–466.
- Wossidlo M, Arand J, Sebastiano V, Lepikhov K, Boiani M, Reinhardt R, Schoeler H, Walter J. 2010. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO J* 29: 1877–1888.
- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Comms* 2: 241.
- Wu H, Zhang Y. 2014. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156: 45–68.

6. SAŽETAK

Metilacija DNA jedan je od izrazito važnih procesa u razvoju sisavaca te u diferencijaciji matičnih stanica koje se tako, poprimajući specifičan ekspresijski obrazac zahvaljujući epigenetskim modifikacijama njihovih genoma, usmjeravaju u točno određeni tip stanica sa specifičnom funkcijom te se sprječava njihovo vraćanje u nediferencirano stanje. Brojni enzimi sudjeluju u uspostavljanju metilacijskih oznaka u DNA te su također otkriveni oni koji pomažu u uklanjanju takvih oznaka. Naime, upravo je uklanjanje metilacijskih oznaka važno za pravilan razvoj predimplantacijskog embrija budući da se tada odvija veliki val epigenetskog reprogramiranja u kojemu se uklanjaju epigenetske oznake s roditeljskih genoma, koji pritom slijede različite mehanizme demetilacije, te se uspostavlja pluripotentno stanje stanica koje će potom omogućiti njihovu diferencijaciju. Razvitak tehnika sekvenciranja i analize epigenoma u pojedinim stadijima ranog embrionalnog razvitka omogućili su veće razumijevanje epigenetskog reprogramiranja u razvoju sisavaca te su dosadašnja saznanja o istom predstavljena u ovom radu.

7. SUMMARY

DNA methylation is one of extremely important processes in mammalian development and in differentiation of the stem cells which are, by establishing specific expression pattern thanks to epigenetic modifications of their genomes, directed in determined cell type with specific function and their return to undifferentiated condition is prohibited. Numerous enzymes are involved in DNA methylation and the ones that help in removing methylation were also discovered. The removal of methylation is important for regular development of preimplantation embryo, since a big wave of epigenetic reprogramming takes place then which enables removal of epigenetic marks from parental genomes, that undergo different mechanisms of demethylation, and establishment of pluripotency in the cells which are going to differentiate later. Developing of sequencing techniques and epigenome analysis in certain stages of early embryonal development have enabled greater understanding of epigenetic reprogramming in mammalian development and knowledges about it so far are presented in this paper.